

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-159077

(P2003-159077A)

(43)公開日 平成15年6月3日(2003.6.3)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 H 21/00	4 B 0 2 4
C 0 7 H 21/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00		G 0 1 N 30/00	A 4 C 0 5 7
G 0 1 N 30/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願2001-361840(P2001-361840)

(22)出願日 平成13年11月28日(2001.11.28)

(71)出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72)発明者 牧野 快彦

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写

真フイルム株式会社内

(72)発明者 森 寿弘

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写

真フイルム株式会社内

(74)代理人 100085109

弁理士 田中 政浩

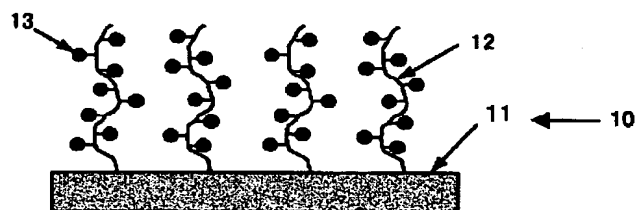
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸の分離精製方法及び核酸分離精製ユニット

(57)【要約】

【課題】 分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有する物を大量に生産可能である固相を使用した、操作の自動化が可能な核酸の分離精製方法、及びその方法を実施するのに適した核酸分離精製ユニットを提供する。

【解決手段】 上記課題は、親水基を有するグラフトポリマー鎖が表面に結合されている基材から成る固相を使用する核酸の分離精製方法、及び少なくとも二つの開口を有する空間内に、親水基を有するグラフトポリマー鎖が表面に結合されている基材から成る固相を備えている核酸分離精製ユニットにより解決される。



(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 親水基を有するグラフトポリマー鎖が表面に結合されている基材から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法。

【請求項2】 親水基が水酸基である請求項2に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項3】 少なくとも二個の開口を有する空間内に、親水基を有するグラフトポリマー鎖が表面に結合されている基材から成る固相を備えている核酸分離精製ユニット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、分子生物学の分野に関する。特に、本発明は核酸を分離精製する方法、及びその方法を用いた核酸を分離精製するユニットに関する。

【0002】

【従来の技術】核酸は、様々な分野で、種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

【0003】診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現および種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の分離精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】広く知られた精製方法の一つに、カオトロピック塩の存在下で、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の表面に吸着させ、引き続く洗浄、脱着等の操作によって精製する方法がある（例えば、特公平7-51065号公報）。この方法は、分離性能としては優れているが、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい、また操作の自動化が困難等の問題点がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、検体中の核酸を固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する方法に使用する、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同

2

一の分離性能を有する物を大量に生産可能である固相を使用した、操作の自動化が可能な核酸の分離精製方法、及びその方法を実施するのに適した核酸分離精製ユニットを提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の課題は、核酸を固相に吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法において、親水基を有するグラフトポリマー鎖が表面に結合されている基材から成る固相を使用する核酸の分離精製方法、及び少なくとも二個の開口を有する空間内に、親水基を有するグラフトポリマー鎖が表面に結合されている基材から成る固相を備えている核酸分離精製ユニットにより達成された。ここで、本発明において「核酸」は一本鎖核酸、二本鎖核酸のいずれでもよく、またDNA、RNAの制限も、分子量の制限も無い。

【0008】本発明で使用する、グラフトポリマー鎖が表面に結合している基材から成る固相においては、グラフトポリマー鎖は片末端が基材表面に強固に結合されると共に、グラフトポリマー鎖中には、水酸基に代表される親水基、即ち核酸吸着バッファの存在下で、核酸の吸着に関与する基が、固相表面の単位面積に対して高密度で存在するため、高密度で核酸を吸着することが可能となる。さらに、親水基を有するグラフトポリマー鎖が互いに架橋されておらず、溶液中で自由な動きをとることができ、運動性の高い状態を維持するため、グラフトポリマー鎖にある親水基と核酸との吸着性が高まり、高効率での核酸の吸着および脱着が実現できたものと考えられる。

【0009】

【発明の実施の形態】以下に本発明の実施の形態について詳細に説明する。

【A. 基材】本発明で使用する基材としては、特に制限はなく、目的に応じて選択して使用することができる。基材の材質としては、ガラス、セメント、セラミックス、ニューセラミックスなどの無機非晶質材料を使用することができるが、加工の容易性の観点から、有機高分子材料を使用することが好ましい。

【0010】上記の有機高分子材料としては、例えばセルローストリブチレート、セルロースアセテートブチレート、セルローストリアセテート及びそれらの鹸化物、ポリアセタール、ポリアミド（脂肪族ポリアミドやアラミドなどの芳香族ポリアミドを含む）、ポリアミドイミド、ポリアリレート、ポリイミド、ポリエーテルイミド（PEI）、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、ポリエーテルサルホン（PES）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリエチレンナフタレート（PEN）、ポリカーボネート、ポリサルホン（PSF）、ポリスチレン、ポリセルローストリアセテート及びその鹸化物、ポリフェニレンサルファイド（PPS）、ポリフェニレンオキシド（PPO）、ポリベンゾ

(3)

3

オキサゾール、非晶ポリアクリレート (PAR) 等が挙げられる。

【0011】また、その他の有機高分子材料として、エポキシ樹脂、アクリル樹脂、ウレタン樹脂、フェノール樹脂、スチレン系樹脂、ビニル系樹脂、ポリエステル樹脂、ポリアミド系樹脂、メラミン系樹脂、ホルマリン樹脂などの合成樹脂、ゼラチン、カゼイン、セルロース、デンプンなどの天然樹脂なども基材として使用することができる。

【0012】基材は、基材自体が非孔性の板状物、柱状物、粒状物 (ビーズ) または管状物等である他、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、メンブレンフィルター等の多孔性の板状物、柱状物、粒状物 (ビーズ) または管状物等であってもよい。また、板状物、柱状物、粒状物 (ビーズ) または管状物等の表面に、前記のような材料を原料とする皮膜を一体に形成したものであってもよい。さらに、前記のような材料を原料とする長繊維或いは短繊維を用いて形成された織布、編物、不織布などの形状をとるものであってもよい。

【0013】基材自体が、微細加工 (Micro Fabrication) で成形された三次元構造体であってもよい。また、微細加工で成形された三次元構造体の表面に、前記のような材料を原料とする皮膜を形成したものであってもよい。このように基材自体が微細加工で成形された三次元構造体をとることで、固相の表面積が増し、より効率よく核酸を分離精製することが可能になるというメリットがある。また、微量液体を移送するマイクロ流体技術 (Micro Fluidics) と組み合わせ、非常に微細な空間で非常に微量な試料液から、核酸を分離精製することができるというメリットがある。

【0014】本発明においては、上述した種々の基材上に中間層を設けた材料も基材に含まれる。

【0015】[B. 表面] 本発明において、基材が多孔質である場合には、「基材の表面」は基材の外表面のみではなく、基材内の孔の表面をも含む。

【0016】[C. 親水基] 本発明において、基材表面に結合しているグラフトポリマー鎖が有している親水基とは、水との相互作用を持つことができる有極性の基 (原子団) を指し、核酸吸着バッファの存在下、核酸の吸着に関与する全ての基 (原子団) が当てはまる。親水基としては、水との相互作用の強さが中程度のものが良く、水酸基、カルボキシル基、シアノ基、オキシエチレン基などを挙げることができるが、好ましくは水酸基である。

【0017】[D. 核酸吸着バッファ] 本発明で使用する核酸吸着バッファ溶液は主剤、緩衝剤、必要に応じて界面活性剤を含む水-エタノール溶液である。主剤としては、溶液中の水和分子から水分子を除去し、例えば溶液中の蛋白質の三次元構造を不安定化する能力を持つ物

4

質として知っている化合物を使用することができ、塩酸グアニジン、イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン、過塩素酸ナトリウム、沃化ナトリウムなどを使用することができるが、特に塩酸グアニジンの使用が好ましい。緩衝剤としては、Tris、EDTAなどを、界面活性剤としてはTriton-X100などを使用することができる。これらの内では、塩酸グアニジン及びTrisを含む溶液を好ましく使用することができる。緩衝剤の好ましい濃度は10~100mM、界面活性剤の好ましい濃度は0.1~10%である。

【0018】[E. グラフトポリマー鎖] 本発明において、基材の表面に結合されているグラフトポリマー鎖には特に制限はなく、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有するグラフトポリマー鎖であれば、いずれも使用することができる。

【0019】以下に、このようなグラフトポリマー鎖を基材表面に導入する方法について説明する。本発明における固相は、基材の表面にグラフトポリマー鎖が結合されていることを特徴とする。これはグラフトポリマー鎖が、直接基材の表面に結合しているものでもよく、また、基材表面にグラフトポリマー鎖が結合しやすい中間層を設けて、その層の上に末端に反応性の官能基を有するポリマー鎖がグラフトされているものでもよい。さらに、本発明における固相には、グラフトポリマー鎖が幹高分子化合物に結合したポリマー、またはグラフトポリマー鎖が幹高分子化合物に結合し、かつ、架橋しうる官能基が導入されたポリマーを用いて、基材表面上に配置されたものも包含される。

【0020】本発明に用いられるグラフトポリマー鎖の特徴は、ポリマーの末端が基材表面、または基材表面層に結合しており、且つ、核酸吸着バッファの存在下で、核酸の吸着に関与する親水基が存在するグラフト部分が実質的に架橋されていない構造を有することにある。図1に、本発明に係る基材の表面に親水基を有するグラフトポリマー鎖が結合した固相の概念図を示す。この構造により、核酸が吸着および脱着し得る親水基を有するポリマー部分の運動性が制限されたり、強固な架橋構造内に埋没されることがなく、高い運動性を保持できる特徴を有する。このため、グラフトポリマー鎖にある親水基への核酸の吸着性が高まり、高効率での核酸の吸着および脱着が実現できるものと考えられる。このようなグラフトポリマー鎖の分子量は、Mw500~500万の範囲であり、好ましい分子量は、Mw1000~100万の範囲であり、さらに好ましくは、Mw2000~50万の範囲である。なお、基材表面自身が核酸の吸着能を有する場合には、基材表面にも核酸が吸着されてよい。

【0021】図1において、10はグラフトポリマー鎖が表面に結合されている基材から成る、本発明に係る固相である。11は基材、12はグラフトポリマー鎖、13は親水基である。

(4)

5

【0022】本発明においては、(1)グラフトポリマー鎖が直接基材表面、若しくは、基材表面上に設けた中間層の上に結合しているものを「表面グラフト」と称し、(2)グラフトポリマー鎖がポリマー架橋構造の中に導入されているものを用いる場合は「グラフト鎖導入架橋層」と称する。

【0023】[(1) 表面グラフトの作製方法] 基材表面にグラフトポリマー鎖を結合する方法としては、基材とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる方法と、基材を基点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させグラフトポリマー鎖とする2つの方法がある。

【0024】まず、基材とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる方法について説明する。この方法においては、ポリマーの末端または側鎖に基材と反応する官能基を有するポリマーを使用し、この官能基と、基材表面の官能基とを化学反応させることでグラフトさせることができる。基材と反応する官能基としては、基材表面の官能基と反応し得るものであれば特に限定はないが、例えば、アルコキシシランのようなシランカップリング基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、リン酸基、エポキシ基、アリル基、メタクリロイル基、アクリロイル基等を挙げることができる。

【0025】ポリマーの末端、または側鎖に反応性官能基を有するポリマーとして特に有用な化合物は、トリアルコキシシリル基をポリマー末端に有するポリマー、アミノ基をポリマー末端に有するポリマー、カルボキシル基をポリマー末端に有するポリマー、エポキシ基をポリマー末端に有するポリマー、イソシアネート基をポリマー末端に有するポリマーである。また、この時に使用されるポリマーとしては、核酸吸着バッファの存在下で、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、具体的には、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレンなどを挙げることができる。その他、以下の表面グラフト重合で使用される、核酸吸着バッファの存在下で、核酸の吸着に関与する親水基を有するモノマーの重合体、またはそのようなモノマーを含む共重合体を有利に使用することができる。

【0026】基材を基点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させ、グラフトポリマー鎖を形成させる方法は、一般的には表面グラフト重合と呼ばれる。表面グラフト重合とは、プラズマ照射、光照射、加熱などの方法で基材表面上に活性種を与え、基材と接するように配置された重合可能な二重結合を有する化合物を重合によって基材と結合させる方法を指す。

【0027】本発明を実施するための表面グラフト重合

6

法としては、文献記載の公知の方法をいずれも使用することができる。例えば、新高分子実験学10、高分子学会編、1994年、共立出版(株)発行、P135には、表面グラフト重合法として、光グラフト重合法、プラズマ照射グラフト重合法が記載されている。また、吸着技術便覧、NTS(株)、竹内監修、1999、2発行、P203、P695には、 γ 線、電子線等の放射線照射グラフト重合法が記載されている。光グラフト重合法の具体的方法としては、特開昭63-92658号公報、特開平10-296895号公報、及び特開平11-119413号公報に記載の方法を使用することができる。プラズマ照射グラフト重合法、放射線照射グラフト重合法においては、上記記載の文献、及びY. Ikeda et al, *Macromolecules*, vol. 19, P1804 (1986)などに記載の方法を適用することができる。

【0028】具体的には、PETなどの高分子表面を、プラズマまたは電子線にて処理して表面にラジカルを発生させ、その後、その活性表面と親水基を有するモノマーとを反応させることによりグラフトポリマー鎖が結合された表面層を得ることができる。

【0029】光グラフト重合は、上記記載の文献のほかに、特開昭53-17407号公報(関西ペイント)や、特開2000-212313号公報(大日本インキ)に記載されているように、フィルム基材の表面に光重合性組成物を塗布し、その後、水性ラジカル重合化合物とを接触させて光を照射することによっても実施することができる。

【0030】(表面グラフト重合するのに有用な重合可能な二重結合を有する化合物) 本発明において、基材に結合しているグラフトポリマー鎖を形成するのに有用な化合物は、重合可能な二重結合を有しており、かつ、分子内に核酸吸着バッファの存在下で核酸の吸着に関与する親水基を有するという、2つの特性を兼ね備えていることが必要である。これらの化合物としては、分子内に二重結合を有していれば、親水基を有するポリマー、オリゴマー、モノマーのいずれの化合物をも用いることができる。特に有用な化合物は親水基を有するモノマーである。本発明で有用な親水基を有するモノマーとは、水酸基、カルボキシル基、シアノ基などの基を有するモノマーである。

【0031】本発明において、特に有用な親水基を有するモノマーの具体例としては、次のモノマーを挙げることができる。例えば、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセロールモノメタクリレート等の水酸基含有モノマーを特に好ましく用いることができる。また、アクリル酸、メタアクリル酸等のカルボキシル基含有モノマー、もしくはそのアルカリ金属塩及びアミン塩も好ましく用いることができる。

(5)

7

【0032】[(2) グラフト鎖導入架橋層の作製方法] 本発明に係るグラフト鎖が導入された架橋層は、一般的にグラフト重合体の合成法として公知の方法を用いてグラフトポリマー鎖を作製し、それを架橋することで作製することができる。具体的には、グラフト重合体の合成は“グラフト重合とその応用”井手文雄著、昭和52年発行、高分子刊行会、及び“新高分子実験学2、高分子の合成・反応”高分子学会編、共立出版(株)(1995)に記載されている。

【0033】グラフト重合体の合成は、基本的に、1. 幹高分子から枝モノマーを重合させる、2. 幹高分子に枝高分子を結合させる、3. 幹高分子に枝高分子を共重合させる(マクロマー法)、の3つの方法に分けられる。これら3つの方法のうち、いずれを使用しても、グラフトポリマー鎖が表面に結合した基材を作製することができるが、特に、製造適性、膜構造の制御という観点からは「3. マクロマー法」が優れている。マクロマー法を使用したグラフトポリマー鎖の合成は前記の“新高分子実験学2、高分子の合成・反応”高分子学会編、共立出版(株)(1995)に記載されている。また山下雄他著“マクロモノマーの化学と工業”アイビーシー(1989)にも詳しく記載されている。

【0034】本発明で使用する親水基を有するマクロマーのうち特に有用なものは、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセロールモノメタクリレート等の水酸基含有モノマーから誘導されるマクロマー、アクリル酸、メタクリル酸等のカルボキシル基含有のモノマーから誘導されるマクロマーである。これらのマクロマーのうち有用な分子量は、100~10万の範囲、好ましい範囲は1000~5万、特に好ましい範囲は1500~2万の範囲である。分子量が400以下では効果を発揮できず、また10万以上では主鎖を形成する共重合モノマーとの重合性が悪くなる。

【0035】これらのマクロマーを合成後、グラフト鎖が導入された架橋層を作製する一つの方法は、上記の親水基を有するマクロマーと、親水基を有する他のモノマーとを共重合させ、グラフト共重合ポリマーを合成し、その後合成したグラフト共重合ポリマーとポリマーの親水基と反応する架橋剤とを基材上に塗布し、熱により反応させて架橋させ作製する方法である。また、他の方法としては、親水基を有するマクロマーと光架橋性基もしくは重合性基を有するグラフトポリマー鎖を合成し、それを基材上に塗布して光照射により反応させて架橋させ作製する方法が挙げられる。

【0036】次に、表面に親水基を有するグラフトポリマー鎖が結合した基材から成る、本発明に係る固相を用いた核酸の精製方法について説明する。本発明において使用できる核酸を含む試料液に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、

8

血清、尿、便、精液、唾液、喀痰等の体液等から調製された溶液が対象となる。

【0037】最初にこれらの検体液を細胞膜を溶解破壊する試薬を含む溶液で処理する。これにより核膜が溶解破壊されて、核酸が溶液内に分散する。細胞膜を溶解破壊する試薬としては、プロテアーゼKが挙げられる。

【0038】このように核酸が分散した溶液中に、核酸吸着バッファ液を添加して、固相と接触させる。この操作により、試料液中の核酸が固相中のグラフトポリマー鎖の親水基に、及び場合によっては固相中の基材にも吸着される。

【0039】核酸吸着バッファ液中に細胞膜を溶解破壊する試薬を添加した溶液を使用して上記検体液を処理することもできる。

【0040】次いで、この核酸が吸着した固相を洗浄バッファ液に接触させる。この溶液は核酸と一緒に固相に吸着した試料液中の不純物を洗い流す機能を有する。従って、固相から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。洗浄バッファ液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む溶液からなる。主剤としてはメチルアルコール、エチルアルコール、ブチルアルコール、アセトン等の約10~90%(好ましくは約50~90%)の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エチルアルコール、Tris及びTriton-X100を含む溶液を好ましく使用することができる。Tris及びTriton-X100の好ましい濃度は、それぞれ10~100mM、及び0.1~10%である。

【0041】次に、固相に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液に、上記洗浄後の固相を接触させる。固相を接触させた後の溶液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)による核酸の増幅に提供する。この核酸を脱着せしめうる溶液としては、精製蒸留水、TEバッファ等が使用できる。

【0042】実際の核酸分離精製操作においては、少なくとも二個の開口を有する空間(ホルダー)内に固相を備えた、核酸分離精製ユニットを使用することが好ましい。空間を形成する容器の材料に特別な限定はなく、固相を備えることができ、かつ少なくとも二個の開口を設けることができればよいが、製造の容易性からプラスチックが好ましい。

【0043】図2に、少なくとも二個の開口を有する空間内に固相を備えた、本発明の核酸分離精製ユニットの概念図を示した。また、図3に、基材自体が微細加工(Micro Fabrication)で成形された三次元構造体である場合の、本発明の核酸精製ユニットの概念図を示した。いずれも基本的には、固相を収容した空間を持ち、固相が試料液等の移送時に収容空間の外

(6)

9

へは出ることがなければ良い。試料液の移送には、空気圧力、遠心力、電気浸透力、電気泳動力などを用いることができる。

【0044】図2において、20は本発明に係る核酸分離ユニットの一態様である。21はホルダー、22は本発明に係る固相、23はホルダーの開口である。本態様においては、ホルダー21と固相22は分離して形成されていても、ホルダー自体が固相22を形成する基材を兼ねていてもよい。後者の態様では、親水基を有するポリマーは、ホルダーを形成する材料に結合されている。

【0045】図3において、30は本発明に係る核酸分離ユニットの別の態様である。31はホルダー、32は基材自身が微細加工で成形された三次元構造体である本発明に係る固相、33はホルダーの開口である。本態様においては、ホルダー31と固相32は分離して形成されていても、ホルダー31自体の一部が微細加工で成形された三次元構造体であり、固相32を形成する基材を兼ねていてもよい。

【0046】上記核酸分離精製ユニットの一方の開口から核酸を含む試料液を導入し、空気圧力などで試料液を移送して固相に接触させ、その後、試料液をもう一方の開口から排出し、次いで洗浄バッファ溶液を一方の開口から導入して固相に接触させ、もう一方の開口から排出し、次いで、固相に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液を一方の開口から導入して固相に接触させ、もう一方の開口から排出して、この排出液を回収することにより、目的とする核酸を得ることができる。

【0047】固相を、核酸及び核酸吸着バッファ溶液を含む試料溶液、核酸洗浄バッファ溶液、及び固相に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液中に順次浸漬しても目的* 30

(核酸吸着バッファ)

塩酸グアニジン (ライフテクノロジー社製)	382 g
Tris (ライフテクノロジー社製)	12.1 g
Triton-X100 (ICN社製)	10 g
エタノール	300 ml
蒸留水	700 ml

【0054】

(洗浄バッファ)

100mM Tris-HCl

【0055】(d) 核酸分離精製操作
真空採血管を用いて採血したヒト全血100 μ Lに、上記(c)に示した処方の核酸吸着バッファ溶液100 μ LとプロテアーゼK10 μ L添加して、60℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、エタノール100 μ Lを添加して攪拌した。攪拌後、上記の様に処理した試料液を、(b)で作成した核酸分離精製ユニットの一方の開口から導入し、試料液を固相1の表面に接触させ、さらに核酸分離精製ユニットのもう一方の開口に接続した注射器を用いて、液を吸入し、次いで排出した。

【0056】排出後直ちに、洗浄バッファ溶液0.5m 50

10

* とする核酸を得ることができる。

【0048】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0049】

【実施例】(a) 固相(グラフトポリマー鎖が表面に結合している基材)の作成

膜厚188 μ mの2軸延伸ポリエチレンテレフタレートフィルム(A4100, 東洋紡(株)社製)を用い、平版マグネトロンスパッタリング装置(芝浦エレクトック製, CFS-10-EP70)を使用して、下記の条件で酸素グロー処理を行った。

【0050】(酸素グロー処理条件)

初期真空 : 1.2 $\times 10^{-3}$ Pa

酸素圧力 : 0.9Pa

RFグロー : 1.5KW

処理時間 : 60sec

【0051】次に、グロー処理したフィルムを窒素バブルした2-ヒドロキシエチルアクリレートの水溶液(10Wt%)に70℃で5時間浸漬した。その後、浸漬したフィルムの表面をメタノールにて5時間洗浄することによって、ヒドロキシエチルアクリレートのグラフトポリマー鎖を表面に有する基材(固相1)を得た。

【0052】(b) 核酸分離精製ユニットの作成

2つの開口を有し、上記(a)で作成した固相1(基材面積: 1.0cm²)を収容した空間を持つ、核酸分離精製ユニットをハイインパクトポリスチレンで作成した。

【0053】(c) 核酸吸着バッファ溶液及び洗浄バッファ溶液の調製

以下に示す処方の核酸吸着バッファ溶液及び洗浄バッファ溶液を調製した。

70%エタノール

40 Lを核酸分離精製ユニットの一方の開口から導入し、核酸分離精製ユニットのもう一方の開口に接続した注射器を用いて液を吸入し、次いで排出して、核酸精製ユニット内部及び固相1の表面を洗浄した。

【0057】核酸精製ユニット内部及び固相1の表面の洗浄後、100 μ Lの精製蒸留水を核酸分離精製ユニットの一方の開口から導入し、を固相1の表面に接触させた後、核酸分離精製ユニットのもう一方の開口に接続した注射器を用いて、液を吸入し、次いで排出して、この排出液を回収した。

【0058】(e) 核酸の回収量、純度、PCR増幅の

(7)

11

確認

(核酸の回収量、純度の確認) 上記(d)で回収した排出液の吸光度を測定して、核酸の回収量及び純度を定量した。回収量は波長260nmの吸光度により定量し、また、核酸の純度は260nmと280nmでの吸光度の仕率(A260/A280:この仕率が1.8以上であれば純度は良好であると判断される)により決定したところ、回収量が5.4μg、A260/A280=1.*

<反応液の組成>

精製水	36.5μL
10×PCRバッファー	5μL
2.5mM dNTP	4μL
Taq FP (ニッポンジーン社製)	0.5μL
20μM プライマー	2μL
上記(d)で回収した排出溶液	2μL

【0061】プライマーは、p53遺伝子エクソン6の部分の特異的に認識できるように設計した塩基配列を持つ、オリゴヌクレオチドのプライマーのセット(プライマー1、プライマー2)として合成したものを使用した。

【0062】<プライマーの塩基配列>

プライマー1: 5'-GCGCTGCTCAGATAGCGATG-3'

プライマー2: 5'-GGAGGGCCACTGACAACCA-3'

PCR増幅後の溶液を用いて、通常の方法でゲル電気泳動を行ったところ、目的の275bpの箇所に一本のバンドとしてPCR産物が確認された。

【0063】これらの結果から、固相1(ヒドロキシエチルアクリレートのグラフトポリマー鎖を表面に有する基材)及びそれを備えた核酸分離精製ユニットを用いて、試料溶液から核酸を高純度で分離精製することができ、得られた核酸を用いてPCRを実施できることがわかる。

【0064】

【発明の効果】分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有する物を大量に生産可能である固相を用いた、操作の自動化が可能な、本発明に係る核酸の分離精製方法により、核酸を含む試料溶液から純度の高い核酸を分離することができ

*902であった。

【0059】(PCR増幅の確認)

以下に示す反応液の組成で、PCRによる核酸断片の増幅を実施した。PCRは、[デネイチャー: 94℃・30秒、アニーリング: 65℃・30秒、ポリメラーゼ伸長反応: 72℃・1分]を30サイクル繰り返すことで実施した。

【0060】

る。更に本発明に係る核酸分離精製ユニットを使用すれば、操作が容易となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、親水基を有するグラフトポリマー鎖が基材表面に結合している、本発明に係る固相の概念図である。

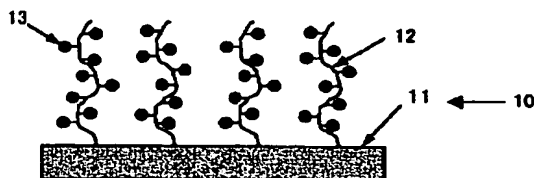
【図2】 図2は、本発明に係る固相を備えている核酸分離精製ユニットの斜視図である。

【図3】 図3は、本発明に係る固相自体が微細加工で成形された三次元構造体をとっている場合の核酸分離精製ユニットの斜視図である。

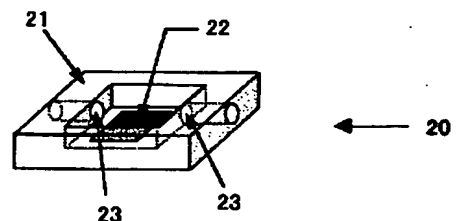
【符号の説明】

- 10…固相
- 11…基材
- 12…グラフトポリマー鎖
- 13…親水基
- 20…核酸分離精製ユニット
- 21…ホルダー
- 22…固相
- 23…開口
- 30…核酸分離精製ユニット
- 31…ホルダー
- 32…微細加工された三次元構造体である固相
- 33…開口

【図1】

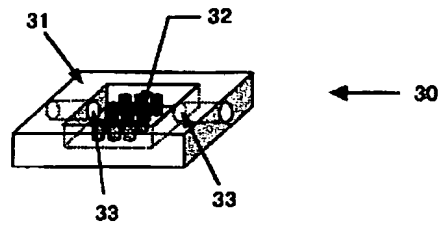


【図2】



(8)

【図3】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA05 HA08 HA12
4B029 AA21 AA23 AA27 BB20 CC04
FA12
4C057 AA05 AA11 MM01